



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

LUANA LIRA MATOS FERREIRA

**PERFIL ENZIMÁTICO E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ESPÉCIES DE *Bacillus* ASSOCIADOS A MICROALGA *Arthrospira platensis***

FORTALEZA

2023

LUANA LIRA MATOS FERREIRA

**PERFIL ENZIMÁTICO E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ESPÉCIES DE *Bacillus* ASSOCIADOS A MICROALGA *Arthrospira platensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Microbiologia do Pescado.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F441p Ferreira, Luana Lira Matos.
Perfil enzimático e de resistência a antimicrobianos de espécies de *Bacillus* associados a microalga *Arthrospira platensis* / Luana Lira Matos Ferreira. – 2023.
57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

1. Cianobactéria. 2. Caracterização. 3. Antibiótico. I. Título.

CDD 639.2

LUANA LIRA MATOS FERREIRA

**PERFIL ENZIMÁTICO E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
ESPÉCIES DE *Bacillus* ASSOCIADOS A MICROALGA *Arthrospira platensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Microbiologia do Pescado.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

Aprovada em: 07/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (Orientadora)

Departamento de Engenharia de Pesca/Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza

Departamento de Engenharia de Pesca / Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Deborah Oliveira Amarante

Departamento de Engenharia de Pesca/ Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Deem graças ao Senhor porque Ele é bom;
o seu amor dura para sempre.”

Salmos 107:1

A Deus,

Aos meus pais, Sandra e Fábio e avós, Aila e Caetano (*in memoriam*), meus familiares, minhas gatinhas e meus amigos que amo tanto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela força dada nos dias difíceis.

Aos meus pais, Sandra Lira e Fábio Luiz e meus avós maternos, Francisca Aila e José Caetano, que residem num plano diferente do nosso, mas que sempre me apoiaram, incentivaram e cuidaram de mim em vida, sou eternamente grata por tudo que vocês fizeram.

À minha família, por todo o apoio e suporte de sempre. Em especial a minha madrasta, Ivonete Guerra, por me acolher como filha na sua casa e na sua vida e ter me ajudado em muitas situações difíceis; às minhas tias Tânia, Débora, Jesa e Márcia por estarem sempre me dando todo apoio.

Ao meu irmão, Hudson Lira e família, Isabela Guimarães, Luís Maurício e Maria Luísa. Às minhas gatinhas: Lia, Titia e Mel, que sempre estavam por perto me fazendo sorrir, obrigada! Sem vocês eu certamente não estaria aqui.

A Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes, pela orientação durante esse tempo, obrigada por ser uma pessoa tão leve, cheia de vida e conhecimentos.

A banca examinadora, Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza e Msc. Deborah Oliveira Amarante, pelas sugestões e considerações.

Aos meus amigos da vida, Andreza Ellen, Érica Freitas, Letícia Cristina e Marley Gomes, pelos muitos anos de amizade, risadas, choros e conselhos.

Aos amigos que conheci na UFC: Rayane Fabrício, Karol de Alencar, Amanda Rocha, João Marcelo, Vinícius Cavalcanti e Victor Gabriel.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Maria Tereza, Maria Ariele, Fabíola Araújo, Matheus Samuel, Lucas Daniel, Igor Dantas e Juliana Maia.

Ao Laboratório de Planctologia (DEP/UFC), na pessoa de Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante e todos os seus membros, por terem me acolhido tão bem, por todo aprendizado e terem feito meus olhos brilharem para microalgas, muito obrigada!

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP/LABOMAR/UFC) na pessoa de Oscarina Viana de Sousa e todos os seus membros, pelo acolhimento, pelo aprendizado de uma nova área incrível que tanto amei conhecer e pelo dia a dia.

Ao Departamento de Engenharia de Pesca, professores e funcionários.

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará e seus funcionários.

E a todos que contribuíram para realização do trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

A algacultura consiste na produção de algas e microalgas e tem se destacado em escala global, produzindo 35,1 milhões de toneladas de biomassa só em 2020. É alvo de interesse de diversas indústrias como cosmética, alimentícia e farmacêutica. Uma das microalgas mais cultivadas em escala comercial é a cianobactéria azul-esverdeada *Spirulina (Arthrospira platensis)*, que possui altíssima concentração de ativos benéficos em sua composição. Essa cianobactéria vive associada a outros microrganismos como bactérias do gênero *Bacillus*, conhecidas por seu grande potencial probiótico. Mutações naturalmente acontecem quando a população bacteriana é exposta a certos antimicrobianos. Diante disso, essa pesquisa visa a identificação de espécies e avaliação de cepas resistentes de *Bacillus* isoladas de uma cultura de spirulina localizada no laboratório de Planctologia, em Fortaleza, Ceará. Foram realizadas provas bioquímicas referente a motilidade, produção de indol e sulfeto de hidrogênio (H₂S), citrato, Voges Proskauer, redução de nitrato, testes de perfil enzimático como teste de catalase, amilase, caseinase, gelatinase, lecitinase e uréase, e testes de susceptibilidade a antimicrobianos. A partir das colônias crescidas em meio de cultura ágar TSA foram isoladas 40 cepas, identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*; *Bacillus sp.* (n = 11); 13 espécies, sendo elas: *B. stearothermophilus* (n = 6), *B. macerans* (n = 4) *B. panthotenicus* (n = 4), *B. popillae*, (n = 3), *B. pasteurii* (n = 2), *B. circulans* (n = 2), *B. coagulans* (n = 2), *B. licheniformis* (n = 1), *B. badius* (n = 1), *B. subtilis* (n = 1), *B. megaterium* (n = 1), *B. sphaericus* (n = 1), *B. polymyxa* (n = 1). Vinte e duas cepas apresentam perfil enzimático para amilase (78,5%), dez para caseinase (50%), vinte para lecitinase (62,5%) e cinco para gelatinase (20%). Os maiores índices de resistência antibiótica detectados foram para estreptomicina com 14 (48,2%) cepas resistentes, seguidas de eritromicina com 5 (17,4%), ampicilina com 1 cepa resistente (3,5%). Todas as estirpes foram sensíveis a cloranfenicol que confere a maior efetividade ao fármaco. Diante do exposto serão necessárias mais pesquisas para verificar a eficiência probiótica das cepas analisadas e sua resistência a antimicrobianos, para que possam ser utilizadas sem causar danos aos animais cultivados e seus manipuladores.

Palavras-chave: cianobactéria; caracterização; antibiótico.

ABSTRACT

Algae culture is the algae and microalgae production and it has been increasing in global scale, producing 35,1 million of tonnes of biomass only in 2020. It is the interest target for many industries like cosmetics, food and pharmaceuticals. The most commercially cultivated microalgae is the blue-green cyanobacteria *Spirulina (Arthrospira platensis)*, which has a lot of concentration of benefits in the composition. This cyanobacteria lives in association with other microorganisms such as bacteria of *Bacillus* genus, known for its great probiotic potential. Mutations occur naturally when the bacterial population is exposed to certain antimicrobials. Therefore, this research aims to identify species and evaluate resistant strains of *Bacillus* isolated from a spirulina culture located in Fortaleza, Ceará. Biochemical tests were performed, such as Gram staining, motility, production of indole and hydrogen sulfide (H₂S), citrate, Voges Proskauer, nitrate reduction and enzymatic profile tests such as catalase, amylase, caseinase, gelatinase, lecithinase and urease for phenotypic characterization. From colonies freshly grown on TSA (Tryptic Soy Agar) agar culture medium, 40 strains were isolated, identified as belonging to the genus *Bacillus*; *Bacillus sp.* (n = 11); 13 species as: *B. stearothermophilus* (n = 6), *B. macerans* (n = 4) *B. panthotenicus* (n = 4), *B. popillae*, (n = 3), *B. pasteurii* (n = 2), *B. circulans* (n = 2), *B. coagulans* (n = 2), *B. licheniformis* (n = 1), *B. badius* (n = 1), *B. subtilis* (n = 1), *B. megaterium* (n = 1), *B. sphaericus* (n = 1), *B. polymyxa* (n = 1). Twenty one strains showed enzymatic activity for starch hydrolysis (78,5%), ten for hydrolysis of casein (50%), twenty for lecithinase (62,5%) and five for gelatinase (20%). The highest rates of antibiotic resistance detected were for streptomycin with 14 (48,2%) resistant strains, followed by erythromycin with 5 (17,4%), ampicillin with only 1 resistant strain (3,5%). All strains were sensitive to chloramphenicol (100%), which gives the drug greater effectiveness. Thus, more research will be needed to verify the probiotic efficiency of the analyzed strains and their resistance to antimicrobials, so that they can be used without causing harm to farmed animals and their handler.

Keywords: cyanobacteria; characterization; antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia óptica de <i>A. platensis</i> , evidenciando a estrutura espiralada.	17
Figura 2 – <i>A. platensis</i> e seus inúmeros benefícios como superalimento na promoção da saúde e nutrição.....	18
Figura 3 - Tanque de cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> com recirculação de água em Fortaleza, Ceará.	22
Figura 4 - Fluxograma do procedimento de preparo da amostra e isolamento de bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	23
Figura 5 - Bactérias coradas como Gram-positivas (cor roxa) e apresentando estrutura bacilar.	25
Figura 6 - Fluxograma do procedimento para realização do teste de catalase.....	26
Figura 7 - Placas de vidro inoculadas com as cepas e adicionadas de 1 de H ₂ O ₂ ; A) Catalase negativa, sem reação; B) Catalase positiva, com a formação de bolhas.....	26
Figura 8 - Fluxograma do teste de motilidade e produção de H ₂ S.	27
Figura 9 - Tubos negativos para indol.	28
Figura 10 - A) Tubo de ensaio contendo ágar SIM: negativo para motilidade, à esquerda; e positivo para motilidade, à direita. B) Diferença entre um tubo negativo e positivo para produção de H ₂ S.....	28
Figura 11 - Fluxograma do procedimento para realização do teste de citrato.	29
Figura 12 - Teste do uso de citrato como fonte de carbono. O meio ágar Citrato de Simmons muda para azul, quando é indicativo de positivo, se o meio continuar verde, é negativo.	29
Figura 13 - Fluxograma do procedimento do Teste de Voges Proskauer.....	30
Figura 14 - Tubos contendo meio VM-VP, comparação entre negativo (à esquerda) e positivo (à direita).	30
Figura 15- Jarra de anaerobiose	31
Figura 16 - Fluxograma do procedimento do teste de redução de nitrato.	32
Figura 17 - Tubos com meio nitrato para prova de redução de nitrato a nitrito. A) Comparação do resultado negativo para redução de nitrato a nitrito, mesmo depois da adição de Zinco; Positivo para redução de nitrato a nitrito. B) Tubo positivo e negativo; C) Os dois tubos positivos.....	32
Figura 18 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para amilase.	33
Figura 19 - Placas de amido para detecção de atividade amilolítica, o halo está indicado pelos círculos vermelhos.	34

Figura 20 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para gelatinase.	34
Figura 21 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para caseinase.	35
Figura 22 - Placa para detecção de atividade da caseinase pelo microrganismo, o halo está indicado pelo círculo vermelho.	35
Figura 23 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para lecitinase.	36
Figura 24 - Placa de petri contendo ágar e emulsão de gema de ovo para avaliar a presença de atividade lecitinase/fosfolipase. O círculo vermelho indica a presença de halo.	37
Figura 25 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para urease.	37
Figura 26 - Tubos de ensaio contendo o meio ureia para prova bioquímica de urease. O indicativo de resultado positivo (cor rosa) e negativo (cor amarela).	38
Figura 27 - Fluxograma de antibiograma realizado com as cepas de Bacillus.	39
Figura 28 - Placa de ágar Mueller Hinton, depois de 24h em estufa para medição de halos de inibição.	39
Figura 29 - Teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, depois de 24h em estufa bacteriológica, é possível observar os halos de inibição, com exceção da cepa 04 (B. circulans) frente ao disco EST, sendo resistente.	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de susceptibilidade frente a antimicrobianos de cepas de *Bacillus*.46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns agentes microbianos mais utilizados na aquicultura e sua importância na medicina humana.	21
Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade das cepas de Bacillus isolados de uma cultura de spirulina (<i>A. platensis</i>), frente a 5 antibióticos comerciais.	40
Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos das cepas isoladas de uma cultura de <i>Arthrospira platensis</i>	41
Tabela 4 - Espécies encontradas em associação com <i>A. platensis</i>	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>).....	17
2.2 <i>Bacillus</i>	19
3 METODOLOGIA.....	22
3.1 Coleta da Amostra.....	22
3.2 Preparo da amostra.....	23
3.3 Contagem.....	23
3.4 Coloração de Gram.....	24
3.5 Identificação fenotípica das cepas isoladas de <i>Bacillus</i> sp.	25
3.5.1 Provas bioquímicas.....	25
3.5.2 Prova de catalase.....	25
3.5.4 Teste de Citrato.....	28
3.5.5 Teste de Voges Proskauer (VP).....	29
3.5.6 Teste da Redução de Nitrato.....	31
3.6.1 Hidrólise do amido (amilase).....	33
3.6.2 Hidrólise da gelatina (gelatinase).....	34
3.6.3 Hidrólise da caseína (caseinase).....	35
3.6.4 Hidrólise da lecitina (lecitinase ou fosfolipase).....	36
3.6.5 Hidrólise da Ureia (Urease).....	37
3.7 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Caracterização fenotípica.....	41
4.3 Teste de Voges Proskauer, Motilidade, Indol, Citrato, Catalase.....	44
4.5 Antibiograma.....	45
5 CONCLUSÃO.....	49

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura consiste na cadeia de produção de organismos aquáticos e está em constante ascensão, especialmente em países em desenvolvimento, pois é uma atividade importante que contribui com a geração de emprego e renda. O crescimento da atividade já ultrapassa qualquer outro tipo de produção de alimentos e é crucial na luta contra o combate à fome no mundo (FAO, 2016, 2020; MMANDA *et al.*, 2020; MACIEL & VALENTI, 2014; LAMEIRA-SILVA *et al.*, 2020).

Em 2020, a aquicultura teve uma produção total de 87,5 milhões de toneladas destinada ao consumo humano e 35,1 milhões de toneladas de algas e microalgas (NOGUEIRA *et al.*, 2020; FAO, 2022). A cultura de microalgas tem se destacado, alcançando produtividade em escala comercial, devido a estrutura celular microalgal conter uma infinidade de metabólitos potencialmente atrativos para diversas indústrias, tais como: cosmética, alimentícia e farmacêutica (DENER, 2006; FARAHIN *et al.*, 2019).

Uma das microalgas de maior importância cultivada em escala comercial é a Spirulina (*Arthrospira platensis*), é a mais apreciada em, pelo menos, 22 países e conta com uma produção de cerca de 60% de biomassa algal global (LIMA, 2018). Essa cianobactéria ou microalga azul-esverdeada, possui formato espiralado e apresenta altíssima concentração de ativos benéficos em sua composição como aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. Além de possuir fácil manejo em cultivo, cianobactérias são as fontes mais potentes de produção de químicos, fármacos e antimicrobianos (EMBRAPA, 2016; ZHANG, 2019; PATIL *et al.*, 2015; BANCALARI *et al.* 2020). *Arthrospira platensis* é geralmente cultivada em escala industrial, em tanque *outdoor* monoalgal, que inibe qualquer outro tipo de floração de cianobactérias produtoras de toxinas. Entretanto, existem riscos potenciais associados com esse tipo de produção em larga escala, no qual o cultivo pode estar suscetível a contaminação por bactérias provenientes de animais e até da própria água, podendo se tornar patógenos contaminantes (VARDAKA *et al.*, 2016). Tais bactérias como as do gênero *Bacillus* podem ser encontradas no cultivo.

Bacillus é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonete, são móveis e tem capacidade de formar esporos resistentes. Na literatura, a família Bacillaceae é a mais abundantemente encontrada em associação com *A. platensis*. Roadhes (2023) encontrou 13,5% de isolados de *Bacillus* em amostras de spirulina, seguido da família Rhodobacteraceae (9,5%) e Enterobacteriaceae (6,8%). A presença de *Bacillus* em alguns produtos pode ser prejudicial

devido a produção de enterotoxinas, correndo o risco de ocasionar doenças transmitidas por alimentos (DTA's) causadas por espécies de *Bacillus cereus*, por exemplo. Por outro lado, algumas estirpes de *Bacillus* são muito estudadas para produção de probióticos na aquicultura, devido a sua capacidade de esporulação, quando aplicada em rações, potencializa a sua vida útil (VARDAKA *et al.*, 2016; KATZ E DEMAIN, 1977; RINGO *et al.*, 2018; YILMAZ *et al.*, 2020).

Probióticos são utilizados com o objetivo de controle de doenças, aumento do crescimento dos organismos cultivados providenciando nutrientes, moldando microbiota, melhorando as respostas imunes, atividade enzimática, digestibilidade e a qualidade da água. Pesquisas recentes buscam encontrar soluções ambientalmente corretas para doenças em sistemas aquícolas e os probióticos surgiram como uma boa alternativa aos antimicrobianos (KUEBUTORNYE, 2019). Particularmente em países em desenvolvimento, o uso generalizado e descontrolado de antibióticos na aquicultura é frequentemente comum, no intuito de prevenir infecções por agentes patogênicos e surtos de doenças. Como resultado, grandes quantidades de resíduos antibióticos se perpetuam no meio ambiente, o que leva à resistência bacteriana pelo seu uso frequente (CABELLO, 2006; HOLMSTRÖM *et al.* 2003).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2021, afirmou que a resistência bacteriana origina mutações quando a população bacteriana é exposta a certos antimicrobianos. Ademais, a Organização Mundial da Saúde indicou que a resistência a antimicrobianos vem se tornando um dos maiores desafios que a humanidade enfrenta no século 21 e recorreu à situação de “uma estratégia global contra resistência antibiótica” (OMS, 2014).

Diante de algumas divergências na literatura entre as espécies do gênero *Bacillus*, o presente estudo visa a identificação de espécies de *Bacillus* associadas de uma cultura de spirulina, bem como sua classificação quanto a sua patogenicidade, avaliação das cepas quanto seu perfil enzimático e susceptibilidade a antimicrobianos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Spirulina (*Arthrospira platensis*)

As microalgas são microrganismos que possuem pigmentos capazes de realizar a fotossíntese. Elas formam um grupo bastante diversificado de organismos aquáticos microscópicos, incluindo eucariontes e procariontes. Microalgas como *Chlorella* e *Arthrospira platensis* (FIGURA 1) têm sido comercializadas e cultivadas com apelo de ser o superalimento ou comida do futuro (FIGURA 2) pelas suas reservas naturais de grande potencial tecnológico (DIAS, 2019; MARTELLI & ALINOVI, *et al.* 2020).

Figura 1 - Microscopia óptica de *A. platensis*, evidenciando a estrutura espiralada.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 2 – *A. platensis* e seus inúmeros benefícios como superalimento na promoção da saúde e nutrição.



Fonte: Adaptado de LAFARGA (2020).

Arthrospira, mais conhecida como spirulina, é uma microalga filamentosa azul esverdeada e espiralada, pertencente ao filo Cyanophyta. É considerada muito importante pela possibilidade de extrair proteínas bioativas e como suplemento alimentar. Registros do século 16 até os dias atuais, comprovam a sua utilização, devido aos seus inúmeros benefícios nutricionais, tais como: proteínas (normalmente uma escala de 57–70% de peso seco); sais minerais (ferro, potássio, cálcio, zinco e selênio); vitaminas (B1, B2 e E); precursores vitamínicos (astaxantina, zeaxantina e β -caroteno); ácidos graxos benéficos como o γ -linoleico e o ácido palmítico (MATUFI *et al.*, 2020; LAFARGA, 2020; NEMATOLLAHI, 2020). É encontrada pelo mundo em águas salinas e pode ser cultivada de diversas formas, como em sistemas fotobiorreatores, estruturas de tanques naturais ou artificiais, *raceways*, sistemas abertos (*outdoor*) ou fechados (*indoor*), e até mesmo em sistemas para produção de oxigênio como apoio à vida no espaço (POUGHON *et al.*, 2020).

O cultivo demanda constante agitação da coluna d'água para se certificar de que todas as células recebam luz suficiente para produção fotossintética, e sempre pode variar de acordo com a profundidade do tanque e a concentração de biomassa. As condições ótimas de temperatura, para spirulina, são 35 °C e pH de 9–10, geralmente ajustado com bicarbonato de sódio, em sistemas artificiais. A cianobactéria é tolerante à alcalinidade, o que dá a ela vantagens competitivas em lagos e sistemas com altas taxas de pH, devido à possibilidade de inibição de crescimento de outras algas. Todos esses fatores e nutrientes influenciam na

quantidade e qualidade de biomassa algal que será obtida (RHOADES, 2023; SONI *et al.*, 2019).

Quando a biomassa de *A. platensis* está pronta para ser coletada, ela é filtrada por malhas e seca em estufa; após isso, é prensada em blocos, armazenada para comercialização e posterior uso não só para consumo humano na incorporação de massas, pães, iogurtes, barras nutricionais e suplementação vitamínica, mas também na alimentação animal e em produtos farmacêuticos e cosméticos (FRADINHO *et al.*, 2020; KHEMIRI *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018; RHOADES, 2023).

2.2 *Bacillus*

Pertencente ao filo dos Firmicutes, classe Bacillicuja, ordem Bacillaes, família Bacillaceae: o gênero *Bacillus* é fenotipicamente grande e heterogêneo, já foi identificado 631 espécies existentes (DSMZ, 2023). Se caracterizam por bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, catalase positivas (com raras exceções), temperatura ótima para crescimento variando de 28°C a 35°C, formadoras de esporos resistentes ao calor, ácido e enzimas digestivas (HARSH, 2004; LOPES, 2018; CELANDRONI, 2019).

Devido a sua ampla gama de propriedades fisiológicas e à sua capacidade de produzir numerosas enzimas, metabólitos antibióticos, carotenóides e vitaminas, têm sido amplamente difundidos nas áreas médicas, farmacêuticas, industriais e agrícolas. Membros do gênero são, geralmente, encontrados no solo, ar, poeira, água. Algumas espécies são isoladas do trato intestinal de peixes para serem posteriormente utilizadas como probióticos na aquicultura, por causa da sua habilidade de crescer em ambiente marinho e produzir uma infinidade de compostos bioativos. (HERMOSILLO, 2012; NINAWWE ; SELVIN, 2009).

Tais produtos são caracterizados por um grupo de microrganismos capazes de melhorar a capacidade de absorção do trato digestivo, aprimorando a imunidade intestinal local de peixes. As espécies *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis* e *Bacillus subtilis* são muito utilizadas comercialmente em biotecnologia na área de probióticos na agricultura/aquicultura (KUEBUTORNYE, 2019; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

No geral, as cepas de *Bacillus* apresentam grande interesse científico pelo fato de produzirem uma variedade de compostos químicos. Rabbee *et al.* (2019) pesquisaram sobre moléculas bioativas em cepas de *Bacillus velezensis* e a sua aplicação na agricultura: com relação à probióticos, são menos estudadas, mas, é difundido que os antibióticos produzidos

por essa bactéria são capazes de inibir patógenos intestinais corroborando com o fortalecimento do sistema imune.

As espécies de *Bacillus* são economicamente viáveis no cultivo em laboratório, não-patogênicas e não tóxicas. A grande maioria se mostra inofensiva à saúde humana e animal (CAULIER *et al.*, 2019) mas existem exceções como cepas de *B. thuringiensis* que são empregadas como biopesticidas na agricultura devido a sua capacidade de produzir toxinas, que podem se perpetuar ao longo da cadeia produtiva e serem encontradas em produtos finais, afetando a saúde humana (BONIS, 2021; DE BOCK *et al.*, 2019; BIGGEL *et al.*, 2022).

Bacillus cereus também são produtores de toxinas (enterotoxinas) que geram intoxicações alimentares, como a cereulide, além disso, consegue ser resistente às condições ambientais adversas extremas pela capacidade de esporulação (FAGERLUND, LINDBÄCK, & GRANUM, 2010; YANG *et al.*, 2023).

2.3 Antimicrobianos

Antimicrobianos são medicamentos utilizados na prevenção e no tratamento de doenças em humanos, animais, plantas, na agricultura e aquicultura (OMS, 2021). O uso descontrolado aumentou a ocorrência de resistência (XU *et al.*, 2020).

Segundo a OMS (2021), o aumento de antibióticos resistentes a patógenos é uma das dez ameaças à saúde global. Só em 2019, aproximadamente 1 milhão de pessoas morreram devido às bactérias resistentes (ZHANG *et al.*, 2020). O Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (2023) no “*Bracing for Superbugs: Strengthening Environmental Action in the One Health Response to Antimicrobial Resistance*” prevê que as mortes por infecções causadas pela resistência antibiótica aumentarão muito até 2050.

A capacidade de microrganismos se alterarem e resistirem quando expostos a antimicrobianos, tornando-os ineficazes, é chamada de resistência bacteriana. As bactérias obtêm resistência através de modificação genética, mutações ou transferência horizontal de genes resistentes de outros microrganismos ou combinação inadequada de antibióticos (LARSSON & FLACH, 2022; MAILLARD, 2018).

Recentemente, muitos antibióticos têm sido encontrados no solo, na superfície da água e do substrato (MEHRTENS *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2021; RICO *et al.*, 2019). A problemática de cepas resistentes a antibióticos representa um perigo com impacto global e, portanto, medidas preventivas devem ser tomadas pela adoção de novas alternativas a

antibióticos que ameacem a saúde pública, a segurança alimentar e o meio ambiente (KUEBUTORNYE, 2019).

Na aquicultura, o sistema de cultivo mais utilizado é o intensivo, caracterizado pela alta densidade de estocagem e produção de matéria orgânica que propicia condições de estresse e desencadeia a disseminação de doenças (MITRA *et al.* 2019; NHINH *et al.* 2021).

Na tentativa de solucionar e/ou prevenir enfermidades, a utilização de antibióticos é empregada na ração, injetável ou diretamente na água. Na Tabela 1 encontram-se os principais antibióticos utilizados na aquicultura e a sua devida importância na medicina humana: quando há perfil de resistência, há limite de opções e a utilização destes agentes na aquicultura deve ser evitada ou controlada (GASTALHO *et al.*, 2014).

Quando há uso exacerbado, prejudicará as águas favorecendo os microrganismos patogênicos presentes se acumularem no meio e adquirirem resistência, ameaçando não só os organismos aquáticos cultivados, mas também a cadeia produtiva como um todo, afetando os seres humanos como consumidores finais (MISHRA *et al.* 2017; LULIJWA *et al.* 2020; PATIL *et al.* 2021).

Tabela 1- Alguns agentes microbianos mais utilizados na aquicultura e sua importância na medicina humana.

Antimicrobiano e família de antibiótico	Via de administração em aquicultura	Importância na medicina humana
Ampicilina (aminopenicilinas)	Oral	Elevada
Cloranfenicol (fenicóis)	Oral/banho/injetável	Importante
Eritromicina (macrolídeos)	Oral/banho/injetável	Elevada
Estreptomicina (aminoglicosídeos)	Banho	Elevada

Fonte: Adaptado de GASTALHO *et al.* (2014)

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta da Amostra

O cultivo de spirulina em questão, pertence ao Laboratório de Planctologia, que está localizado no Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA) do Departamento de Engenharia de Pesca, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (DEP/CCA/UFC), na cidade de Fortaleza.

O cultivo é um sistema aberto que consiste em um tanque circular de ferrocimento, com as seguintes dimensões: anel externo com 5,62 m de uma extremidade a outra, 0,60 m de altura e 6 m³ de volume, com um anel interno de diâmetro de 3,5 m e 1,10 m de altura com 8 m³ de volume (FIGURA 3).

Figura 3 - Tanque de cultivo de *Arthrospira platensis* com recirculação de água em Fortaleza, Ceará.



Fonte: O Autor (2022).

A coleta foi realizada na manhã do dia 03 de maio de 2022. A fim de se obter a biomassa úmida algal, foi realizada a aferição dos parâmetros físico-químicos do cultivo (salinidade: 9 ppm; pH: 7.4; absorvância: 0.555) para filtração, que foi realizada por 1 hora, em malha de 100 μ , em seguida, essa biomassa foi lavada e pesada, totalizando 53 gramas de biomassa úmida. A amostra foi duplamente lavada com salina a 10 ppm, filtrada novamente em malha de 100 μ e posteriormente lavada. A biomassa obtida foi acondicionada em recipiente

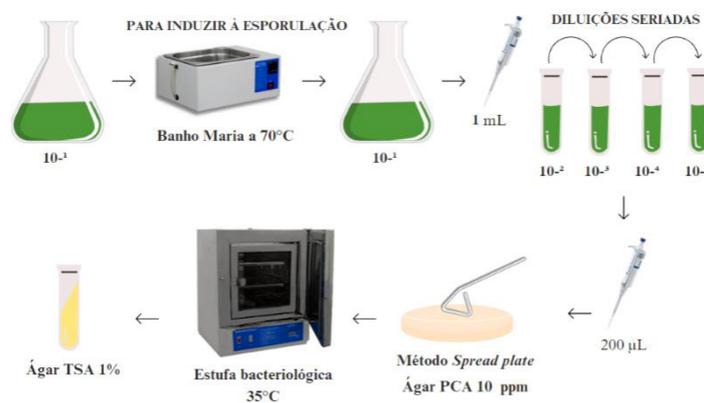
estéril e transportada em caixa isotérmica, até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC (LAMAP/LABOMAR/UFC), no qual a microalga foi processada.

3.2 Preparo da amostra

Foi preparado, em Erlenmeyer, uma mistura de 25 g de biomassa úmida de *A. platensis*, 225 mL de salina a 10 ppm e Tween 80 (1%), esta foi considerada a diluição 10^{-1} . Após isso, foi realizado um banho maria a 70°C por 1 hora, com o objetivo de induzir à capacidade de esporulação das bactérias do gênero *Bacillus* - adaptado de Murray, Breed e Smith (1957).

Após isso foram elaboradas diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-5}) em salina a 10 ppm. De cada diluição foram tomadas alíquotas com um auxílio de uma pipeta de 200 μL , posteriormente, foram inoculadas em duplicata pelo método de semeadura por espalhamento (do inglês, *Spread Plate*) com alças de Drigalski em meio não seletivo PCA, do Inglês, *Plate Count Agar*, a 10 ppm (FIGURA 4).

Figura 4 - Fluxograma do procedimento de preparo da amostra e isolamento de bactérias do gênero *Bacillus*.



Fonte: o Autor (2023).

3.3 Contagem

Após 24h de incubação em estufa bacteriológica a 35°C, as colônias crescidas nas placas PCA contendo um número entre 25 e 250 foram contadas pelo método de Contagem Padrão em Placas - CPP (DOWNES; ITO, 2001).

Posteriormente, foram isoladas 40 colônias típicas do gênero *Bacillus* e semeadas em tubos de ensaio contendo ágar TSA - *Tryptic Soy Agar* (do inglês, Ágar Triptona Soja) adicionado de 10 ppm e incubadas em estufa a 35°C por 24h. Após isso, as cepas foram armazenadas em duplicata.

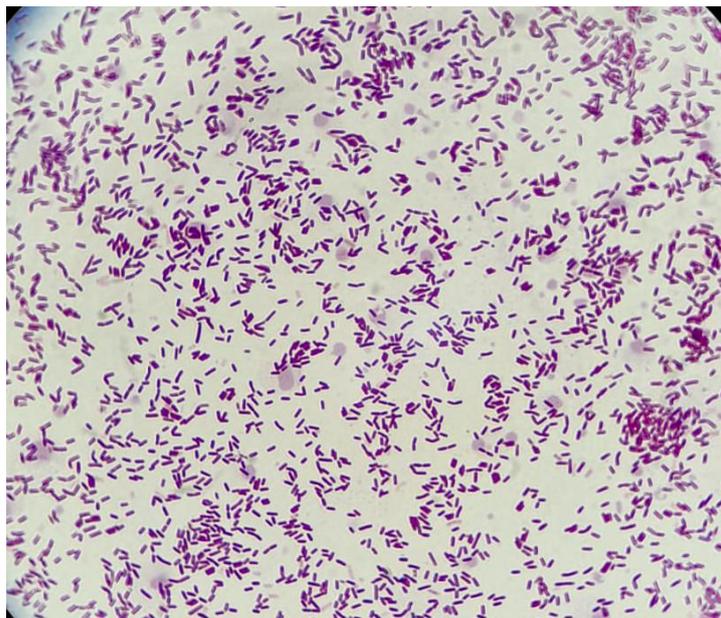
3.4 Coloração de Gram

A coloração de Gram tem como princípio a caracterização morfotintorial para diferenciar bactérias Gram negativas de Gram positivas, tendo como base o tamanho da parede celular de peptidoglicano, que é mais espessa em Gram positivas e mais finas em Gram negativas (TORTORA, 2014).

Primeiramente, são feitos esfregaços da mistura de bactéria com água destilada, depois esses esfregaços são emergidos por 1 minuto em cristal violeta (corante púrpura), com objetivo de corar a parede de bactérias Gram positivas. Posteriormente, é aplicado lugol por 1 minuto para fixação do cristal violeta e depois lavados com álcool cetona para descoloração da parede das Gram negativas. Finalmente, para corar as Gram negativas, deve-se cobrir os esfregaços com safranina (contracorante) por 30 segundos. Para observação no microscópio óptico, deve-se utilizar óleo de imersão em objetiva de 100x (BREED *et al.*, 1948).

Bacillus são bactérias Gram positivas, de formato bacilar, redondas ou esféricas com presença de esporos (FIGURA 5). A partir da cultura pura, crescida em ágar TSA + 1% NaCl por 24h, as lâminas coradas pelo método de Gram, descrito acima (BREED *et al.*, 1948).

Figura 5 - Bactérias coradas como Gram-positivas (cor roxa) e apresentando estrutura bacilar.



Fonte: o Autor (2023)

3.5 Identificação fenotípica das cepas isoladas de *Bacillus* sp.

As provas bioquímicas de identificação seguiram de acordo com a chave de identificação de *Bacillus* proposta por Bergey's (BREED *et al.*, 1948).

3.5.1 Provas bioquímicas

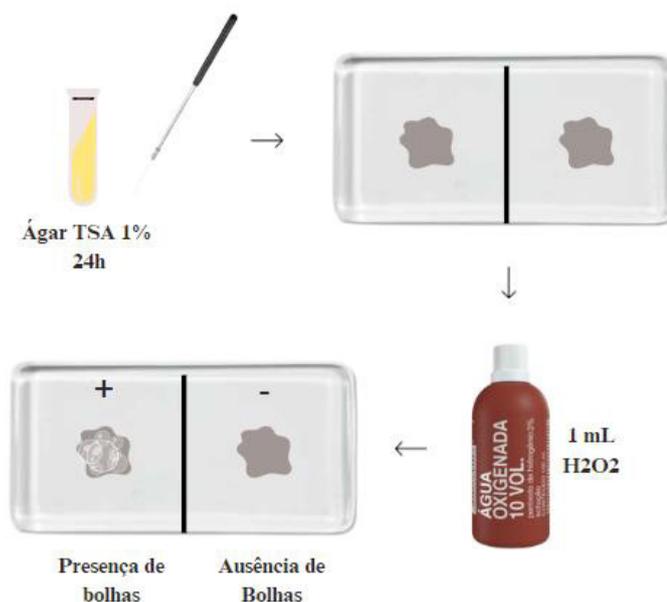
A partir da inoculação em ágar TSA - *Tryptic Soy Agar* (do inglês, Ágar Triptona Soja) adicionado de 1% de NaCl e a posterior incubação em estufa a 35°C por um período de 24h, foi realizada a coloração de Gram e uma série de teste bioquímicos como a prova de catalase, motilidade, produção de indol e sulfeto de hidrogênio (H₂S), teste do citrato, Voges Proskauer (VP), redução de nitrato, hidrólise do amido, caseína, gelatina, lecitina e ureia (BONIS, 2021; PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2018; BREED *et al.*, 1948).

3.5.2 Prova de catalase

A prova de catalase consiste no uso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Deve-se aplicar, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma porção da cultura pura, crescida em ágar

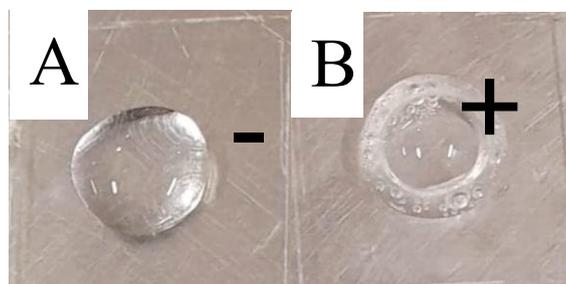
TSA + 1% NaCl por 24h, na superfície de uma placa de vidro e adicionar uma gota de H_2O_2 , o resultado da prova é indicado como positivo se houver formação de bolhas, conforme Figuras 6 e 7 (REINER *et al.*, 2010).

Figura 6 - Fluxograma do procedimento para realização do teste de catalase.



Fonte: O Autor (2023).

Figura 7 - Placas de vidro inoculadas com as cepas e adicionadas de 1 de H_2O_2 ; A) Catalase negativa, sem reação; B) Catalase positiva, com a formação de bolhas.



Fonte: O Autor (2023).

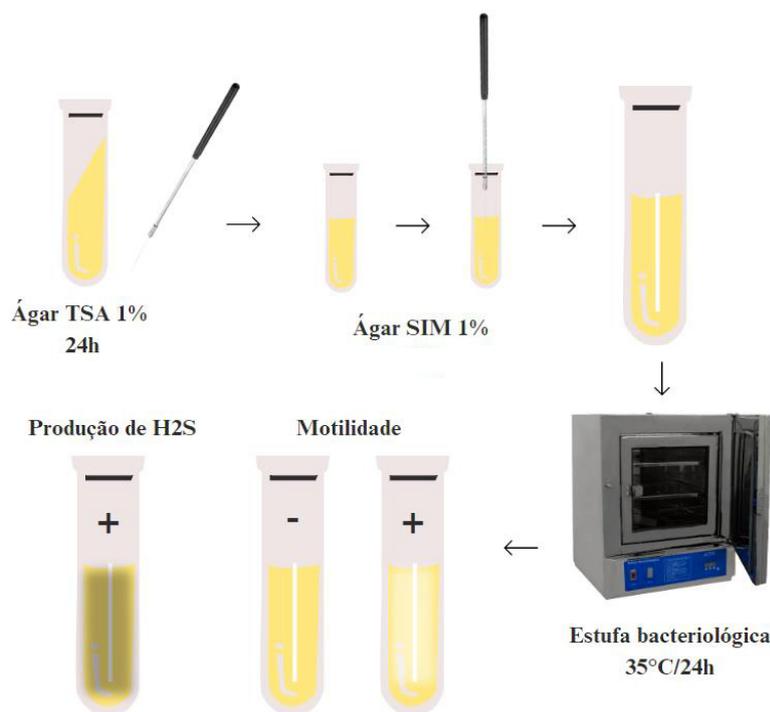
3.5.3 Teste de motilidade, produção de H₂S e Indol

O objetivo do teste é determinar a motilidade, verificar a capacidade do microrganismo de produzir gás sulfídrico e decompor o aminoácido triptofano para indol.

Com a cultura pura, crescida em ágar TSA + 1% NaCl por 24h, utiliza-se uma agulha de inoculação por picada de profundidade para semear o meio ágar SIM (Sulfeto-Indol-Motilidade).

Após isso, é necessário adicionar 200 µL de reagente de Kovacs (preparo de p-dimetilaminobenzaldeído, álcool isoamílico e ácido clorídrico concentrado) por amostra (FIGURA 8), que reagem com o indol e produzem um anel vermelho, indicando resultado positivo, as cepas foram todas negativas como mostra a Figura 9.

Figura 8 - Fluxograma do teste de motilidade e produção de H₂S.



Fonte: O Autor (2023).

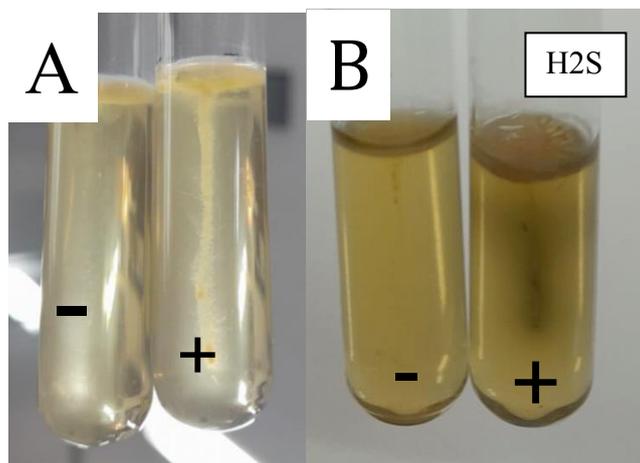
Figura 9 - Tubos negativos para indol.



Fonte: O Autor (2023).

O teste é positivo para produção de H_2S quando há escurecimento do meio; é positivo para motilidade quando há a turvação a partir da picada da agulha (FIGURA 10) (SOARES ; CASIMIRO, 1991; FADDIN, 1980).

Figura 10 - A) Tubo de ensaio contendo ágar SIM: negativo para motilidade, à esquerda; e positivo para motilidade, à direita. B) Diferença entre um tubo negativo e positivo para produção de H_2S .

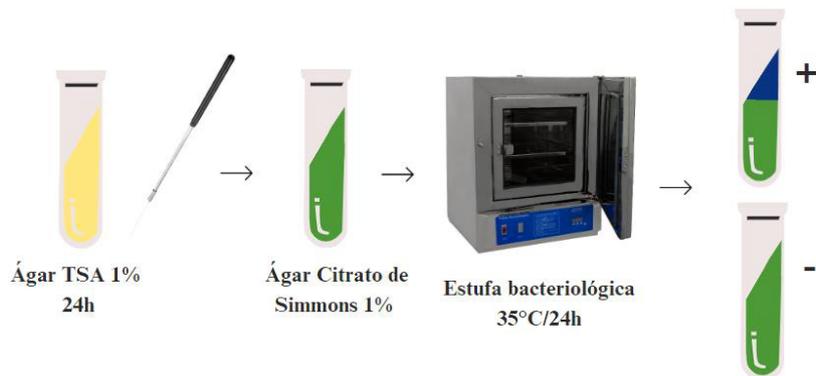


Fonte: O Autor (2023).

3.5.4 Teste de Citrato

O objetivo do teste é determinar a capacidade das bactérias de utilizarem o citrato como única fonte de carbono. Com a cultura pura, crescida em ágar TSA + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, utiliza-se o auxílio de uma agulha de inoculação para estriar a bactéria no ágar citrato de Simmons e é incubado por até 96h a 35°C, conforme Figura 11 (SOARES ; CASIMIRO, 1991; FADDIN, 1980).

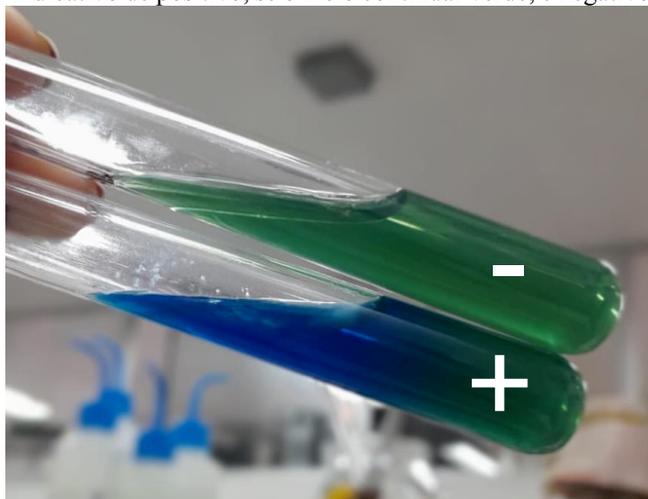
Figura 11 - Fluxograma do procedimento para realização do teste de citrato.



Fonte: O Autor (2023).

O teste é positivo quando o meio muda a coloração de verde para azul (FIGURA 12).

Figura 12 - Teste do uso de citrato como fonte de carbono. O meio ágar Citrato de Simmons muda para azul, quando é indicativo de positivo, se o meio continuar verde, é negativo.



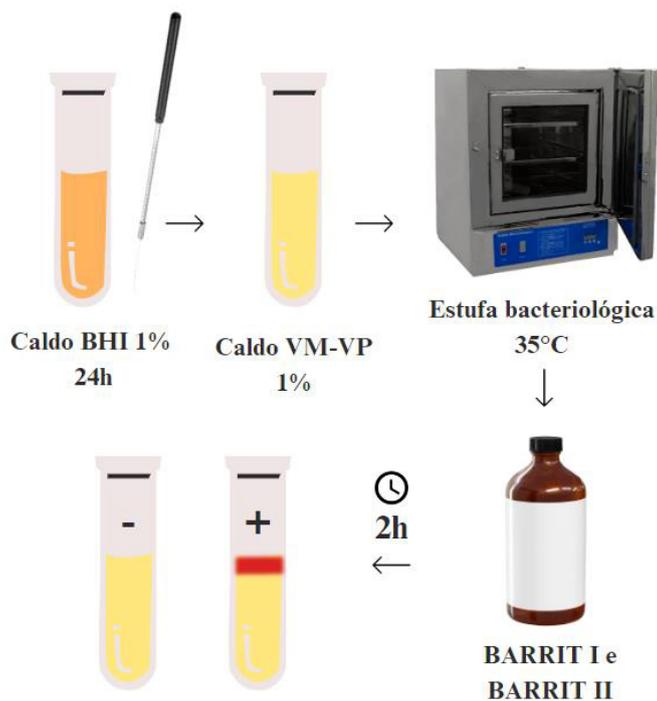
Fonte: O Autor (2023).

3.5.5 Teste de Voges Proskauer (VP)

O teste VP detecta a fermentação e produção de acetoína. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, do inglês, Infusão de Cérebro e Coração) + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, utiliza-se uma alça para inoculação em caldo MR-VP, o meio é incubado por 48h na estufa a 35°C.

Passado o período de incubação, foi adicionado em cada um dos tubos de ensaio, 5 gotas do reagente Barrit I (alfa-naftol) e 2 gotas do reagente Barrit II (KOH a 40%) (FIGURA 13). Deve-se deixar reagir por até 2 horas para se obter os resultados (SOARES ; CASIMIRO, 1991; FADDIN, 1980). O indicativo de resultado positivo é a produção de um anel vermelho no meio, e o negativo, o meio continua amarelo (FIGURA 14).

Figura 13 - Fluxograma do procedimento do Teste de Voges Proskauer



Fonte: O Autor (2023)

Figura 14 - Tubos contendo meio VM-VP, comparação entre negativo (à esquerda) e positivo (à direita).



Fonte: O Autor (2023).

3.5.6 Teste da Redução de Nitrato

O objetivo deste teste é determinar a habilidade do organismo reduzir nitrato a nitrito, ou gás nitrogênio. Prova realizada com jarra de anaerobiose (FIGURA 15) e necessita da utilização de reveladores: reativo de Griess - A (contendo alfa-naftilamina e ácido acético) e reativo de Griess - B (ácido sulfanílico e ácido acético).

Figura 15- Jarra de anaerobiose

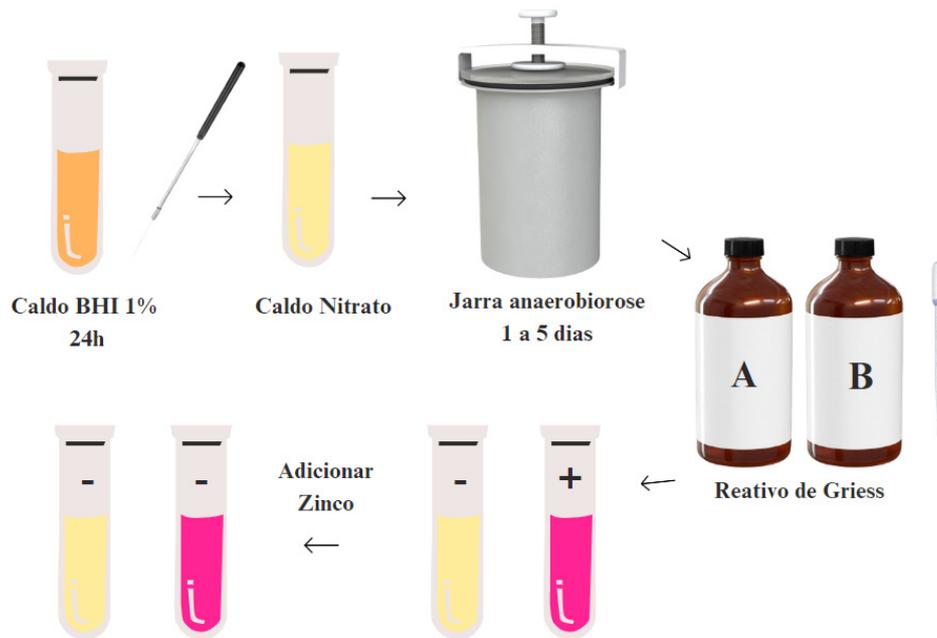


Fonte: O Autor (2023).

Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl, utiliza-se uma alça para inoculação em caldo nitrato com tubo de Durham invertido, sob condição de anaerobiose de 1 até 5 dias.

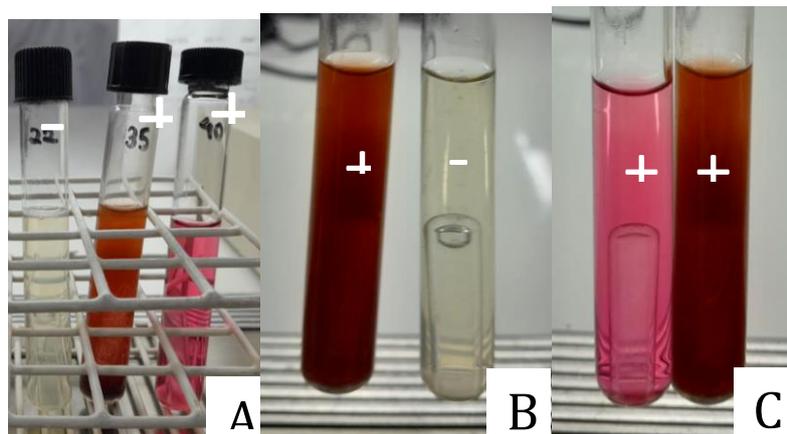
Os tubos que adquirem cor rosa ou vermelha imediatamente após adição dos reveladores, indicam ser positivo para redução de nitrito a nitrato (FIGURA 16). Se adicionado os reativos e os tubos não apresentaram mudança de coloração do meio, adiciona-se uma pequena quantidade de zinco em pó para verificar se o nitrato está presente, produzindo uma mudança de cor imediata para rosa/vermelho, indicando ser negativo para redução de nitrito a nitrato (FIGURA 17). Nos tubos onde não obtiveram mudança de coloração, a bactéria reduziu o nitrato a outros compostos, o que sugere a incapacidade de produção da enzima nitrato redutase.

Figura 16 - Fluxograma do procedimento do teste de redução de nitrato.



Fonte: O Autor (2023).

Figura 17 - Tubos com meio nitrato para prova de redução de nitrato a nitrito. A) Comparação do resultado negativo para redução de nitrato a nitrito, mesmo depois da adição de Zinco; Positivo para redução de nitrato a nitrito. B) Tubo positivo e negativo; C) Os dois tubos positivos.



Fonte: O Autor (2023).

3.6 Enzimas extracelulares

As enzimas são produzidas por diversos microrganismos, incluindo as bactérias, para obter nutrientes do meio externo atuam como catalizadores biológicos, participando de

reações químicas, e não são consumidas ou alteradas (MADIGAN, 2009). Ademais, as reações enzimáticas podem ser utilizadas como identificação fenotípica de bactérias (BONIS, 2021).

3.6.1 Hidrólise do amido (amilase)

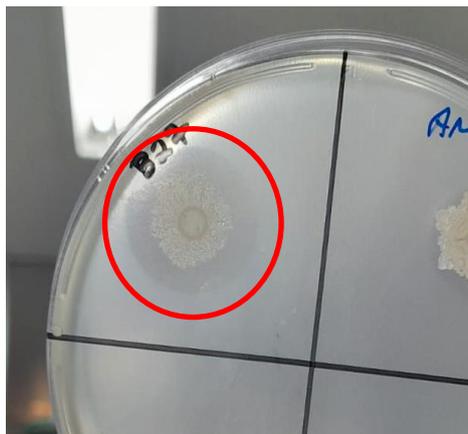
O objetivo desse teste é determinar a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas que hidrolisam o amido. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, toma-se alíquotas de 4 µL com auxílio de uma pipeta e inocula-se em placas de ágar TSA 1% suplementadas com 1% de amido (FIGURA 18). O resultado é positivo quando há a produção de halo transparente ao redor do microrganismo, quando aplicado o lugol, como mostra Figura 19 (RODRIGUES *et al.*, 1993).

Figura 18 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para amilase.



Fonte: O Autor (2023)

Figura 19 - Placas de amido para detecção de atividade amilolítica, o halo está indicado pelos círculos vermelhos.



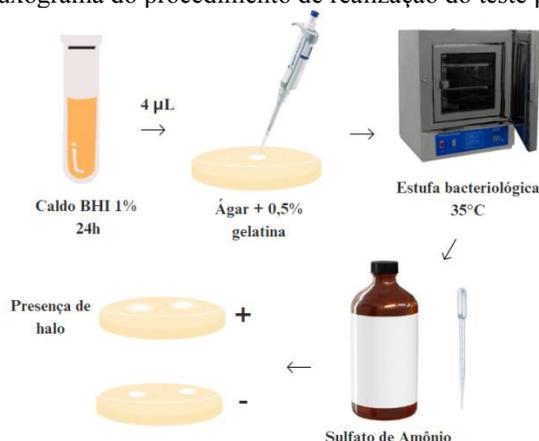
Fonte: O Autor (2023)

3.6.2 Hidrólise da gelatina (gelatinase)

O objetivo desse teste é determinar a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas que hidrolisam a gelatina. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, toma-se alíquotas de 4 µL com auxílio de uma pipeta e inocula-se em meio ágar TSA acrescido de 0,5% de gelatina.

Para interpretação de resultados, deve-se utilizar como revelador o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), o resultado positivo se dá pelo aparecimento de um halo transparente pelo microrganismo e para resultado negativo, não há halo, conforme Figura 20 (AUSTIN, *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 1996; RODRIGUES *et al.*, 1993).

Figura 20 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para gelatinase.



Fonte: O Autor (2023)

3.6.3 Hidrólise da caseína (caseinase)

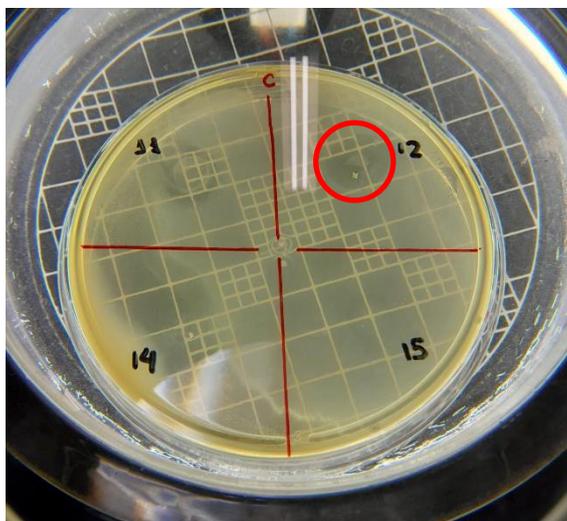
O objetivo desse teste é determinar a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas que hidrolisam a caseína presente no leite. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, toma-se alíquotas de 4 µL com auxílio de uma pipeta e inocula-se em placas de ágar nutriente suplementadas com 1% de leite em pó desnatado e 1% de NaCl. O resultado é positivo quando há a produção de halo ao redor do microrganismo (FIGURAS 21 e 22). A prova foi realizada de acordo com recomendações de Rodrigues *et al.* (1993).

Figura 21 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para caseinase.



Fonte: O Autor (2023)

Figura 22 - Placa para detecção de atividade da caseinase pelo microrganismo, o halo está indicado pelo círculo vermelho.



Fonte: O Autor (2023)

3.6.4 Hidrólise da lecitina (lecitinase ou fosfolipase)

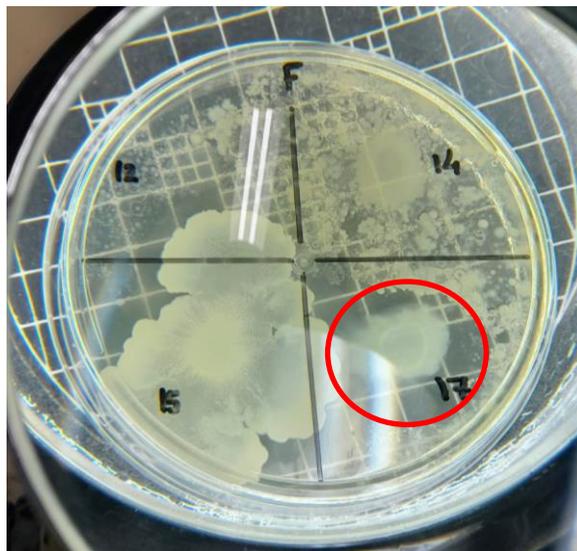
O objetivo desse teste é determinar a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas que hidrolisam lecitina. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, toma-se alíquotas de 4 µL com auxílio de uma pipeta e inocula-se em placas contendo ágar TSA 1% suplementadas com 0,2% de emulsão gema de ovo (gema de ovo + salina 0,85%). O resultado é positivo quando há a produção de halo opaco ao redor da colônia, devido a presença da emulsão de ovo (FIGURAS 23 e 24). O teste foi realizado de acordo com Liu, Lee e Chen (1996).

Figura 23 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para lecitinase.



Fonte: O Autor (2023)

Figura 24 - Placa de petri contendo ágar e emulsão de gema de ovo para avaliar a presença de atividade lecitinase/fosfolipase. O círculo vermelho indica a presença de halo.



Fonte: O Autor (2023).

3.6.5 Hidrólise da Ureia (Urease)

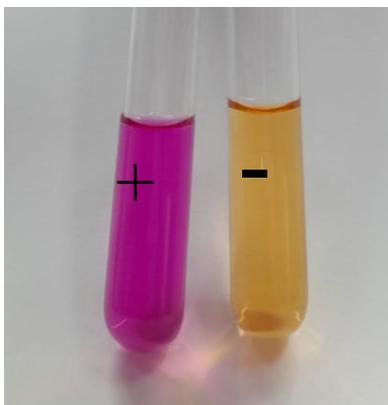
O objetivo deste teste é verificar a presença da enzima urease. Com a cultura pura, crescida em caldo BHI + 1% NaCl por 24h em estufa de 35°C, utiliza-se uma alça para inoculação em meio ureia por filtração. O resultado é positivo quando há mudança de coloração para rosa intenso, indicando alcalinização do meio pela ação da urease sobre a ureia, como mostra as Figuras 25 e 26 (Instrução normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003).

Figura 25 - Fluxograma do procedimento de realização do teste para urease.



Fonte: o Autor (2023)

Figura 26 - Tubos de ensaio contendo o meio ureia para prova bioquímica de urease. O indicativo de resultado positivo (cor rosa) e negativo (cor amarela).



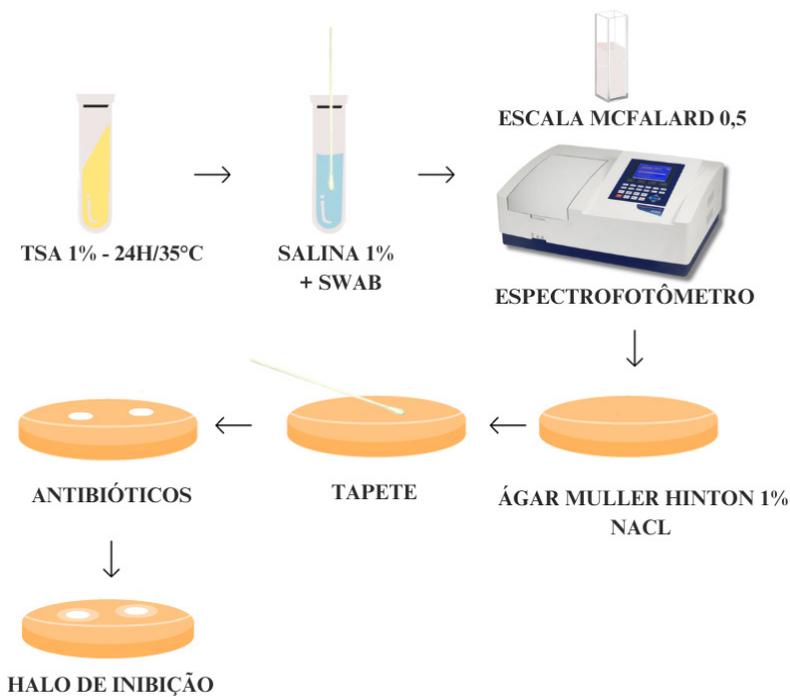
Fonte: o Autor (2023)

3.7 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O meio utilizado foi o ágar Mueller Hinton proposto pela CLSI (2018). Para o antibiograma, foram utilizados cinco discos de diferentes famílias de antibióticos comerciais: β -lactâmicos: Ampicilina - AMP (10 μ g) da marca BBL; Aminoglicosídeos: Estreptomicina - EST (10 μ g) da marca Laborclin; Macrolídeos: Eritromicina - ERI (15 μ g) da marca CECON; Anfencóis: Cloranfenicol - CLO (30 μ g) da marca CECON; e Tetraciclina: Tetraciclina - TET (30 μ g) da marca BBL.

As placas foram estriadas com *swab* embebido em 9 mL de salina NaCl 1% e todos os inóculos foram padronizados de acordo com a escala de *McFallard* a 0,5 (10^8 UFC), sendo aferido por espectrofotometria com comprimento de onda a 625nm, de acordo com a figura 27.

Figura 27 - Fluxograma de antibiograma realizado com as cepas de *Bacillus*.



Fonte: O Autor (2023)

Em seguida, foi feito o tapete para inoculação e deposição dos discos de antibióticos (FIGURA 28).

Figura 28 - Placa de ágar Mueller Hinton, depois de 24h em estufa para medição de halos de inibição.



Fonte: O Autor (2023)

Após incubação a 35°C por 24h, o diâmetro do halo ao redor dos discos foi medido com um paquímetro digital e interpretado como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2021 e a metodologia de Bauer & Kirby.

Abaixo estão tabulados o perfil de susceptibilidade à antimicrobianos em S, I e R dos isolados de *Bacillus*.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade das cepas de *Bacillus* isolados de uma cultura de spirulina (*A. platensis*), frente a 5 antibióticos comerciais.

Antimicrobianos	Disco (em µg)	Susceptibilidade		
		S	I	R
AMP	10	28	0	1
EST	10	15	0	14
ERI	15	23	0	5
CLO	30	29	0	0
TET	30	28	1	0

Fonte: O Autor (2023). Legenda: AMP: Ampicilina; EST: Estreptomicina; ERI: Eritromicina; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina. S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.

A utilização de *Staphylococcus* sp. como parâmetro é convencionada na literatura científica por não haver medidas específicas de *Bacillus* sp. na tabela CLSI para disco-difusão, ambos os gêneros bacterianos são gram-positivos e são evolutivamente próximos entre si, o que faz com que seus mecanismos de aquisição de resistência operem de maneira semelhante e confere segurança ao parâmetro (FIEDLER *et al.*, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas, no total, 40 cepas e identificadas 13 espécies. Todos os isolados foram Gram positivos assim como no trabalho de Hallaj-Nezhadi *et al.* (2022) sobre a caracterização de estirpes de *Bacillus*, onde ressaltam que o gênero tem ocorrência cosmopolita, são encontrados em todas as partes do mundo e são bastante utilizados na produção de probióticos e antimicrobianos.

4.1 Caracterização fenotípica

Todos os resultados para as provas bioquímicas realizadas estão tabulados abaixo (TABELA 3), onde é possível visualizar as cepas que foram positivas (+), negativas (-) e as que não foram possíveis serem testadas estão como sem resultados (s/r).

Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos das cepas isoladas de uma cultura de *Arthrospira platensis*.

Cepas	Amilase	Catalase	Caseinase	Lecitinase	Gelatinase	Urease	Nitrato	SIM *	VP	Citrato
B01	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
B02	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B03	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B04	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B05	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B06	(+)	(+)	(-)	s/r	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B07	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	s/r	(+)	(-)	(-)
B08	(+)	(+)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)
B09	s/r	(-)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)	(-)
B10	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B11	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B12	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	s/r	s/r	(-)	(-)
B13	s/r	(+)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(+)	(-)	(-)
B14	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B15	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	s/r	(+)	(+)	(-)
B16	s/r	(-)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)
B17	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)

Tabela 3 - Resultados dos testes bioquímicos das cepas isoladas de uma cultura de *Arthrospira platensis*. Continuação

B18	s/r	(+)	(+)	s/r	s/r	s/r	(-)	s/r	(-)	(-)
B19	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	s/r	(-)	(+)
B20	(+)	(+)	s/r	(-)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B21	s/r	(+)	s/r	(-)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B22	(+)	(+)	s/r	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)+	(+)	(+)
								H ₂ S		
B23	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	s/r	(+)	(-)
B24	s/r	(-)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)
B25	s/r	(+)	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)
B26	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B27	(+)	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B28	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B29	(+)	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
B30	s/r	s/r	s/r	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B31	(+)	s/r	s/r	(-)	(-)	(-)	s/r	(-)	(-)	(-)
B32	(+)	(+)	s/r	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
B33	s/r	s/r	s/r	(-)	(-)	(-)	s/r	(+)	(-)	(-)
B34	(-)	s/r	(+)	s/r	s/r	(-)	s/r	(+)	(-)	(-)
B35	(+)	s/r	s/r	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
B36	(-)	s/r	(-)	s/r	s/r	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
B37	(-)	(+)	s/r	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
B38	s/r	s/r	(-)	s/r	s/r	(-)	(+)	s/r	(-)	(-)
B39	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(-)	(+)	s/r	(-)	(-)
B40	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	s/r	(+)	(-)	(-)	(-)

Fonte: O Autor (2023). Legenda: (+): positivo; (-): negativo; (*): todas negativas para produção de indol; s/r: Sem resultados.

As bactérias isoladas são do gênero *Bacillus* (n = 40), não foi possível identificar algumas cepas, sendo classificadas apenas como *Bacillus sp.* (n = 11). As espécies identificadas foram: *B. stearothermophilus* (n = 6), *B. macerans* (n = 4), *B. panthotenicus* (n = 4), *B. popillae*, (n = 3), *B. pasteurii* (n = 2), *B. circulans* (n = 2), *B. coagulans* (n = 2), *B. licheniformis* (n = 1), *B. badius* (n = 1), *B. subtilis* (n = 1), *B. megaterium* (n = 1), *B. sphaericus* (n = 1), *B. polymyxa* (n = 1), tabuladas abaixo na Tabela 3.

Tabela 4 - Espécies encontradas em associação com *A. platensis*.

Cepa	Espécie	Cepa	Espécie
B01	<i>B. pasteurii</i>	B21	<i>B. coagulans</i>
B02	<i>B. stearothermophilus</i>	B22	<i>B. subtilis</i>
B03	<i>B. stearothermophilus</i>	B23	<i>B. popillae</i>
B04	<i>B. circulans</i>	B24	<i>Bacillus sp.</i>
B05	<i>B. macerans</i>	B25	<i>Bacillus sp.</i>
B06	<i>B. macerans</i>	B26	<i>B. pasteurii</i>
B07	<i>B. macerans</i>	B27	<i>Bacillus sp.</i>
B08	<i>Bacillus sp.</i>	B28	<i>Bacillus sp.</i>
B09	<i>B. popillae</i>	B29	<i>B. stearothermophilus</i>
B10	<i>B. pantothenicus</i>	B30	<i>B. stearothermophilus</i>
B11	<i>B. popillae</i>	B31	<i>B. coagulans</i>
B12	<i>B. circulans</i>	B32	<i>B. stearothermophilus</i>
B13	<i>B. pantothenicus</i>	B33	<i>Bacillus sp.</i>
B14	<i>B. pantothenicus</i>	B34	<i>B. badius</i>
B15	<i>B. licheniformis</i>	B35	<i>B. polymyxa</i>
B16	<i>Bacillus sp.</i>	B36	<i>Bacillus sp.</i>
B17	<i>B. pantothenicus</i>	B37	<i>B. sphaericus</i>
B18	<i>B. stearothermophilus</i>	B38	<i>Bacillus sp.</i>
B19	<i>B. megaterium</i>	B39	<i>Bacillus sp.</i>
B20	<i>B. macerans</i>	B40	<i>Bacillus sp.</i>

Fonte: O Autor (2023).

4.3 Teste de Voges Proskauer, Motilidade, Indol, Citrato, Catalase

Em uma pesquisa para caracterização de 18 cepas de *Bacillus stearothermophilus*, Suriya *et al* (2022) utilizaram os testes bioquímicos de indol, VP, utilização de citrato como fonte de carbono e catalase, sendo todas positivas para indol; negativas para VP; negativas para citrato; e positivas para catalase.

Os resultados obtidos diferem com o presente estudo, onde todas as cepas apresentaram-se negativas para indol e conferem com os outros testes realizados (com algumas exceções), onde a maioria das estirpes mostraram ser negativas para VP, citrato e positivas para catalase.

O teste de motilidade no ágar SIM identificou que apenas 8 cepas das 30 testadas conseguiram crescer em outras direções da que foi semeada e apenas *B. subtilis* produziu sulfeto de hidrogênio. Em um estudo de Augustine (2023) sobre identificação fenotípica de diversos isolados de bactérias do solo, mostrou que 5 dos isolados de *Bacillus* foram positivos para motilidade.

4.4 Amilase, Caseinase, Lecitinase, Gelatinase e Urease

Vinte e uma das cepas apresentaram atividades amilolíticas. De acordo com Rempel (2018) é importante o estudo do perfil enzimático de spirulina com relação à hidrólise de amido. A utilização de microalgas como biocombustível tem aumentado, devido à procura de alternativas mais limpas de energia e foi observado que a microalga apresenta alta atividade de hidrólise do amido, devido à grande concentração de polissacarídeos.

Das 25 cepas testadas para verificar a atividade de hidrólise da gelatina, apenas 5 obtiveram resultado positivo. De todas 20 estirpes testadas para caseinase, 10 foram positivas.

A prova de lecitinase (ou fosfolipase) revela a capacidade de detectar a lecitinase existente na lecitina da gema de ovo e, além disso, a atividade da enzima lipase. As bactérias que foram testadas para essa prova (n = 24) apenas 10 exibiram atividade. Os resultados diferem com os de Bonis e colaboradores (2021), em seus estudos de caracterização fenotípica de *Bacillus*, 98% dos isolados exibiram atividade de hidrólise de lecitinas com exceção apenas de uma cepa.

Alguns microrganismos têm a capacidade de hidrolisar a ureia a amônia e dióxido de carbono através da enzima urease, no caso desse estudo, apenas 1 tubo alcalinizou o caldo ureia, verificando a presença da urease. Para o teste de redução de nitrato, das 15 cepas testadas, 8 obtiveram resultado positivo para a presença da enzima nitrato redutase.

Em um estudo de Al-Deriny e colaboradores (2020) sobre a aplicação de *B. licheniformis* e Spirulina na dieta de tilápia do Nilo, avaliando perfis enzimáticos, eles concluíram que a combinação dos dois organismos como probiótico em ração, aumenta a taxa de crescimento, respostas fisiológico e imune devido a *B. licheniformis* ter aumentado a proliferação de bactérias benéficas na microbiota do peixe.

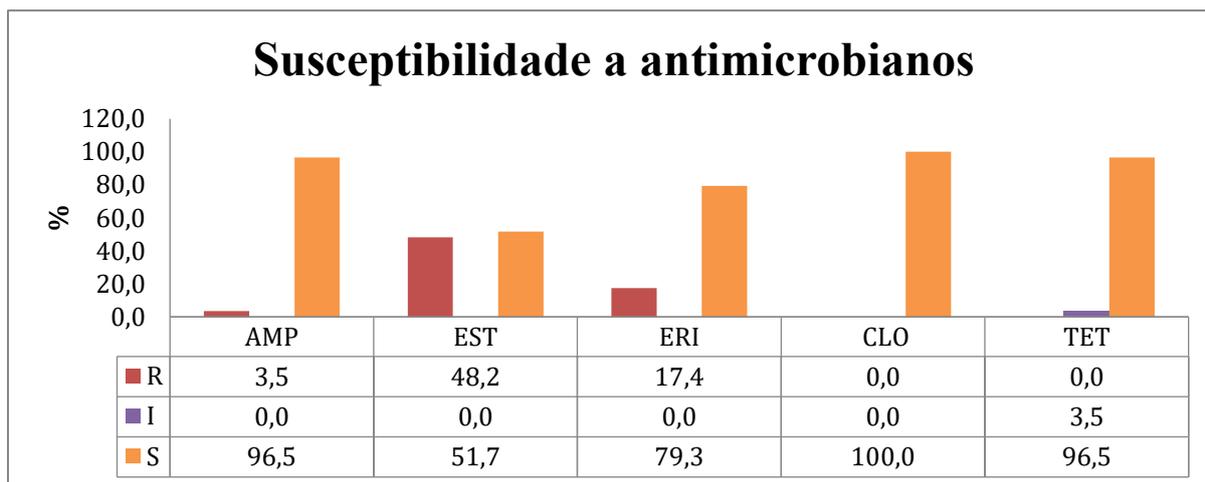
Foi conferido atividade enzimática positiva para catalase, gelatinase e lipase e negativos para amilase em estirpes de *Bacillus* no estudo sobre cepas isoladas de microalgas como *Chlorella* e spirulina que possam ser utilizadas como probióticos em aquicultura, inibindo o crescimento de patógenos como *Vibrio* spp. (ROSLAND *et al.*, 2021).

Rhoades *et al.* (2023) observaram que *Bacillus* sp. são predominantes em amostras de spirulina, dado a sua habilidade de produzir endósporos resistentes. Foram detectadas 6 espécies do gênero, inclusive o potencial patógeno *B. cereus*. A presença do produtor de enterotoxinas em produtos derivados da microalga é preocupante pelo fato de serem recomendados como suplementos para pacientes que podem vir a ser susceptíveis a doenças entéricas.

Por isso, deve-se estudar e avaliar os microrganismos, principalmente do gênero *Bacillus*, que vivem em associação a compostos derivados de utilização em diversas áreas, como a spirulina em suplementação alimentar humana, a fim de se evitar surtos de DTA's por bactérias potencialmente patogênicas.

4.5 Antibiograma

Vinte e nove cepas foram testadas para o teste de resistência à antimicrobianos. Como resultados, ocorreu resistência frente à estreptomicina, eritromicina e ampicilina: 14 cepas, 5 cepas e 1 cepa, respectivamente. Apenas 1 perfil intermediário foi encontrado frente ao disco de tetraciclina e todas as 29 cepas apresentaram sensibilidade a cloranfenicol; 28 foram sensíveis à ampicilina e tetraciclina; 23 à eritromicina e 15 a estreptomicina como mostra o Gráfico 1, em porcentagem.

Gráfico 1 - Gráfico de susceptibilidade frente a antimicrobianos de cepas de *Bacillus*.

Fonte: O Autor (2023). Legenda: AMP: Ampicilina; EST: Estreptomicina; ERI: Eritromicina; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina. S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com Proespraiwong (2023), onde 12 estirpes de *Bacillus* foram classificadas como sensíveis frente a ambos os antibióticos eritromicina e tetraciclina, e com perfil intermediário à estreptomicina.

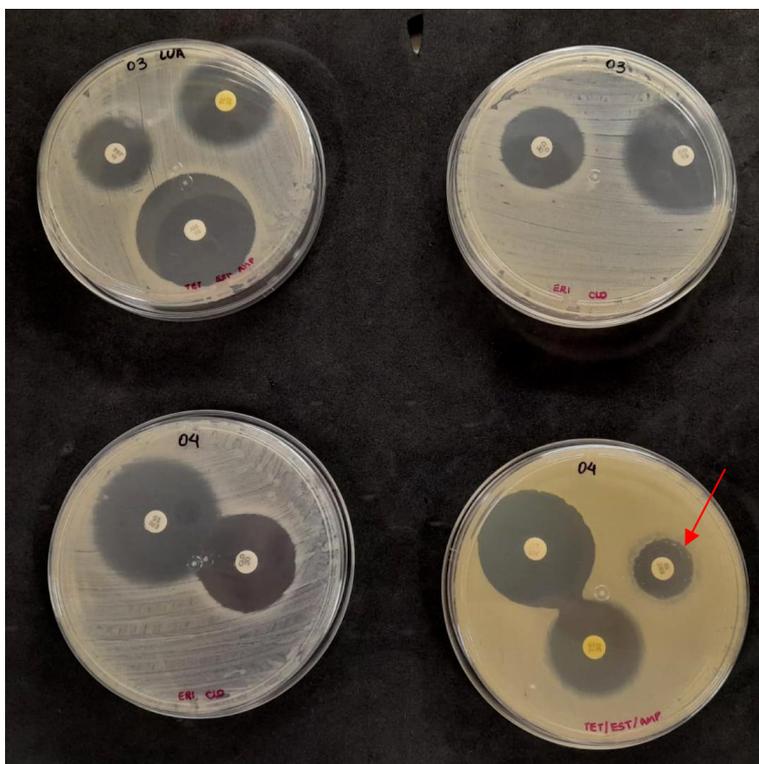
Em uma pesquisa sobre cepas de *Bacillus*, relatou-se que todos *B. paralicheniformis* foram resistentes a cloranfenicol e estreptomicina e isolados de *B. megaterium* foram 100% sensíveis à tetraciclina. Os resultados diferem em parte com os dados obtidos neste trabalho, as cepas presentes neste estudo apresentaram alta taxa de sensibilidade frente a cloranfenicol e grande parte apresentou resistência à estreptomicina, porém, a maioria foi sensível. Todas as estirpes de *B. megaterium*, *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* foram sensíveis à eritromicina, já *B. paralicheniformis* e 23% de *B. licheniformis* foram resistentes (AGERSØ, 2018). Os resultados conferem com o Gráfico 1, onde grande parte dos isolados foram sensíveis à eritromicina.

Dados obtidos e publicados por Ansari *et al.* (2019) sobre susceptibilidade a antimicrobianos, isolados de *B. subtilis* e *B. coagulans*, foram sensíveis à ampicilina, resultados estão de acordo com os do presente estudo, já que apenas uma única estirpe mostrou resistência.

Outro estudo, também de Agersø e colaboradores (2019), sobre a genética de estirpes de *Bacillus*, mostrou que dois genes podem influenciar na sensibilidade reduzida à estreptomicina e à eritromicina, conferindo resistência a eles. Este resultado está de acordo com

o presente estudo onde estreptomicina e eritromicina obtiveram mais resistência do que os demais antibióticos utilizados (FIGURA 29).

Figura 29 - Teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, depois de 24h em estufa bacteriológica, é possível observar os halos de inibição, com exceção da cepa 04 (*B. circulans*) frente ao disco EST, sendo resistente.



Fonte: o Autor (2023)

Resultados diferem com pesquisas sobre caracterização de *Bacillus* de Arafah e Dunlap (2020) que mostraram uma alta resistência contra aminoglicosídeos como estreptomicina, tetraciclina e ampicilina, porém como exceção, os dados se assemelham com a alta sensibilidade apresentada frente ao cloranfenicol.

A resistência a estreptomicina é muito comum dentre as espécies de *Bacillus* spp. E é considerada como um fator genético. Um estudo realizado por Kim (2022) suspeita que exista transferência horizontal de resistência antibiótica intrínseca à genética do gênero. Reforçando a ideia, Agersø e colaboradores (2018) também reportaram potencial resistência a estreptomicina, que contribui para diminuir a sensibilidade a este fármaco em *B. velezensis* quando comparado a estirpes sem esse gene.

É importante estudar a resistência do gênero, mesmo que seja inócuo para seres humanos e animais. A presença de resistência antimicrobiana é uma preocupação global tendo em vista que *Bacillus* são amplamente utilizados como probiótico, pela sua capacidade de produção de endósporos e bactérias possuem mecanismos de compartilhamento de material genético entre si, fato que deve ser investigado rigorosamente (MOAYEDI *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2019; ZHU & XU, 2010).

5 CONCLUSÃO

Identificar e conhecer o perfil de resistência antimicrobiana de bactérias com potencial probiótico é de suma importância e serve como meio de inspeção do surgimento de resistência bacteriana. Embora a maioria das estirpes do gênero *Bacillus* não sejam tão patogênicas quanto outras bactérias, faz-se necessário mais estudos para compreender a resistência, com objetivo de se barrar que estirpes resistentes continuem sendo utilizadas como probiótico para evitar a transferência horizontal de genes de resistência a outros microrganismos patogênicos, o que levaria a crises de saúde pública.

REFERÊNCIAS

AGERSØ, Y. *et al.* “Antimicrobial Susceptibility Testing and Tentative Epidemiological Cutoff Values for Five Bacillus Species Relevant for Use as Animal Feed Additives or for Plant Protection.” **Applied and environmental microbiology**. 2018.

AGERSØ, Y. *et al.* Putative antibiotic resistance genes present in extant Bacillus licheniformis and Bacillus paralicheniformis strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. **PloS one**, 2019.

AL-DERINY, S. H. *et al.* The synergistic effects of Spirulina platensis and Bacillus amyloliquefaciens on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). **Aquaculture Reports**. 2020.

ANSARI, M. J. *et al.* Strain-level diversity of commercial probiotic isolates of Bacillus, Lactobacillus, and Saccharomyces species illustrated by molecular identification and phenotypic profiling. **PloS one**, 2019.

AQUACULTURE Brasil. A IMPORTÂNCIA DAS MICROALGAS NA AQUICULTURA. **Aquaculture Brasil**. Disponível em: <<https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/24/a-importancia-das-microalgas-na-aquicultura>>. 2016. Acesso em: 21 out 2023.

AUSTIN, B. A. D.; SUTHERLAND, R., T. F., & SWINGS, J.; Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) and Artemia nauplii. **Environmental microbiology**, 2005.

AUGUSTINE, A. J.; Degradative Potentials of Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Soil. **BioRxiv**. 2023.

BIGGEL, M., JESSBERGER, N., KOVAC, J., and JOHLER, S. Recent paradigm shifts in the perception of the role of Bacillus thuringiensis in foodborne disease. **Food Microbiology**. 2022.

BONIS, M. *et al.* Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of Bacillus thuringiensis associated with foodborne outbreaks in France. **PloS one**, 2021.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 1957.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**. 2006.

CELANDRONI, F., *et al.* Identification of Bacillus species: Implication on the quality of probiotic formulations. **PloS one**. 2019.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution of Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 2015.

DAWOOD, M. A. O., *et al.* Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). **Aquaculture**, 2019.

DE BOCK, T., ZHAO, X., JOVANOVIĆ, L., RAJKOVIĆ, A., SPANOGHE, P., HÖFTE, M. Food Safety Evaluation of the Use of *Bacillus thuringiensis* as Biological Control Agent in Primary Production of Butterhead lettuce. **24th Conference on Food Microbiology**. 2019.

DENER, R. B., *et al.* Microalgas, produtos e implicações. **Ciência Rural**. 2006.

DIAS, G. *et al.* BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES POR MEIO DA APLICAÇÃO DE MICROALGAS - UMA REVISÃO. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 891–899, ago. 2019.

DOWNES, M. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, 200.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** GmbH. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>>. Acesso em: 10 nov 2023.

EMBRAPA AGROENERGIA: Embrapa Agroenergia. Ano IV. 10. ed. ver., Brasília, DF: **Agroenergia em Revista**, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/manual-deeditoracao/manual-de-editoracao-da-embrapa>>. Acesso em: 9 set 2023.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries Aquaculture**. Contribution to food security and nutrition for all. Rome. 2016. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i5555e/i5555e.pdf>>. Acesso em 18 ago 2023.

FAO. 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. AQUACULTURE PRODUCTION: Overall production status and trend. Rome. 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>>. Acesso em 18 ago 2023.

FRADINHO, P., NICCOLAI, A., SOARES, R., RODOLFI, L., BIONDI, N., TREDICI, M. R., & RAYMUNDO, A. Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. **Algal Research**, 2020.

GASTALHO, S; SILVA, G; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta farmacêutica portuguesa**, 2014.

HALLAJ-NEZHADI, S., HAMDIPOUR, R., SHAHRVIRANI, M. *et al.* Antimicrobial activity of Bacillus sp. isolated strains of wild honey. **BMC Complement Med Ther**22. (2022).

HARSH, P. B., RAY FALL, J. M. V., Biocontrol of Bacillus subtilis against Infection of Arabidopsis Roots by Pseudomonas syringae Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production, **Plant Physiology**. 2004,

HERMOSILLO, O. A. M. *et al.* Use of probiotics in aquaculture. **International Scholarly Research Notices**, 2012.

HOLMSTRÖM, K. *et al.* Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International journal of food science & technology**, 2003.

KHEMIRI, S., KHELIFI, N., NUNES, M. C., FERREIRA, A., GOUVEIA, L., SMAALI, I., & RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. **Algal Research**, 2020.

KIM, S.-H.; YEHUDALA, G.A.; BANG, W.Y.; YANG, J.; JUNG, Y.H.; PARK, M.-K. Safety Evaluation of *Bacillus subtilis* IDCC1101, Newly Isolated from Cheonggukjang, for Industrial Applications. **Microorganisms** 2022.

KUEBUTORNYE, F, KA; ABARIKE, E D; LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, 2019.

KUMAR, B. R., DEVIRAM, G., MATHIMANI, T., DUC, P. A., PUGAZHENDHI, A. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2019.

LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.G. Spirulina for the food and functional food industries. **Food Research**. 2020.

LALLOO, R. *et al.* Isolation and Selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. **Journal of Applied Microbiology**. 2007.

LAMEIRA SILVA, O. L. L., MACEDO, A. R. G., NUNES, E. S. C. L., CAMPOS, K. D., TIBURCO, X., ARAUJO, L. C. C., PINTO, A. S. O., JOELE, M. R. S. P., FERREIRA, M. S., SILVA, A. C. R., RAICES, R. S. L., CRUZ, A. G., JUEN, L., & ROCHA, R.M. Effect of environmental factors on the fatty acid profiles and physicochemical composition of oysters (*Crassostrea gasar*) in Amazon estuaries farming. **Aquaculture Research**, 2020.

LIMA, G.M.; TEIXEIRA, P.C.N.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; FILÓCOMO, D.; LAGE, C.L.S. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**. 2018.

LIU, P.C LEE, K. K; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**. 1996.

LULIJWA R, RUIPIA EJ, ALFARO AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. **Reviews in Aquaculture**. 2020.

- MACIEL, C. R., & VALENTI, W. C. Effect of tank colour on larval performance of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Aquaculture Research**. 2014.
- MACWILLIAMS, Maria P. Indole test protocol. **American Society for Microbiology**, 2012.
- MAILLARD, J. Y. Resistance of Bacteria to Biocides. **Microbiology Spectrum**. 2018.
- MADIGAN, M., OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Microbiology**. 2009.
- MEHRTENS, A., LICHA, T., BROERS, H.P., BURKE, V., Tracing veterinary antibiotics in the 496 subsurface - A long-term field experiment with spiked manure. **Environmental Pollution**. 2020.
- MEIRELES, M. A. O. M. Uso de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana: Aspectos Socioeconômicos e Comportamentais e seu Impacto Clínico e Ecológico. 2008.
- MISHRA SS, RAKESH D, DHIMAN M, CHOUDHARY P, DEBBARMA J, SAHOO SN, MISHRA CK. Present status of fish disease management in freshwater aquaculture in India: State of the art. **Journal of Aquaculture & Fisheries**. 2017.
- MITRA S, KHAN MA, NIELSEN R. Credit constraints and aquaculture productivity. **Aquaculture Economics & Management**. 2019.
- MMANDA, F. P., MULOKOZI, D. P., LINDBERG, J. E., NORMAN HALDÉN, A., MTOLERA, M., KITULA, R., & LUNDH, T. Fish farming the availability and nutritive value of local feed ingredients. **Journal of Applied Aquaculture**. 2020.
- MOAYEDI, A., MORA, L., ARISTOY, M., HASHEMI, M., SAFARI, M., & TOLDR' A, F. ACE. Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fragments Obtained from Tomato Processing By-Products Fermented Using *Bacillus subtilis*: Effect of Amino Acid Composition and Peptides Molecular Mass Distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016.
- MOTA L.M., VILAR F.C., DIAS L.B.A., NUNES T.F, MORIGUTI J.C. Antimicrobianos. **Medicina**. 2010.

NEMATOLLAHI, M.A.; LAIRD, D.W.; HUGHES, L.J.; RAEISSADATI, M.; MOHEIMANI, N.R. Effect of organic carbon source and nutrient depletion on the simultaneous production of a high value bioplastic and a specialty pigment by *Arthrospira platensis*. **Algal Research**. 2020.

NHINH DT, LE DV, VAN KV, HUONG GIANG NT, DANG LT, HOAI TD. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. **Antibiotics**. 2021.

NINAWA, A. S; SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. **Critical reviews in microbiology**. 2009.

NOGUEIRA, S. M. S., SANTOS, M. A., LORDELO, S. A. V., & FARIAS FILHO, J. R. Continental aquaculture: a model for the development of its regularization. **Scientiarum. Technology**. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antimicrobial resistance: **Key facts**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 13 set. 2023.

PAN, Z., YANG, S., ZHAO, L., LI, X., WENG, L., SUN, Y., LI, Y., Temporal and spatial variability 531 of antibiotics in agricultural soils from Huang-Huai-Hai Plain, northern China. **Chemosphere**. 2021.

PATEL, P., JETHANI, H., RADHA, C., VIJAYENDRA, S. V. N., MUDLIAR, S. N., SARADA, R., & CHAUHAN, V. S. Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. **Journal of Food Science and Technology**. 2019.

PATIL, P.K, GEETHA, R., BHUVANESWARI, T., SARASWATHI, R., *et al.* Use of chemicals and veterinary medicinal products (VMPs) in Pacific whiteleg shrimp, *P. vannamei* farming in India. **Aquaculture**. 2022.

PATIL, S., AL - ZAREA, B. K., MAHESHWARI, S., SAHU, R. Antioxidants spirulina and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**. 2015.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T., *et al.* Probiotics in aquaculture: a current assessment. **Reviews in Aquaculture**, 2014.

POUGHON, L., LAROCHE, C.; CREULY, C.; DUSSAP, C.-G.; PAILLE, C.; LASSEUR, C.; MONSIEURS, P.; HEYLEN, W., CONINX, I.; MASTROLEO, F.; *et al.* *Limnospira indica* PCC8005 growth in photobioreactor: Model and simulation of the ISS and ground experiments. **Life Science Space Research**. 2020.

PRIYADARSHANI I, RATH B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal biomass**. 2012.

PROESPRAIWONG, P. *et al.* Evaluation of *Bacillus* spp. as Potent Probiotics with Reduction in AHPND-Related Mortality and Facilitating Growth Performance of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Farms. **Microorganisms**. 2023.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Identification of *Bacillus* species. **UK Standards for Microbiology Investigations**. 2018. Disponível em <<https://www.gov.uk/uk-standards-formicrobiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>>. Acesso em 11 ago 2023.

REINER, K. Catalase test protocol. **American society for microbiology**, 2010.

REMPEL, A., *et al.* Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource technology**. 2018.

RHOADES, J.; FOTIADOU, S.; PASCHALIDOU, G.; PAPADIMITRIOU, T.; ORDÓÑEZ, A.Á.; KORMAS, K.; VARDAKA, E.; LIKOTRAFITI, E. Microbiota and Cyanotoxin Content of Retail *Spirulina* Supplements and *Spirulina* Supplemented Foods. **Microorganisms**. 2023.

RHOADES, J.; FOTIADOU, S.; PASCHALIDOU, G.; PAPADIMITRIOU, T.; ORDÓÑEZ, A.Á.; KORMAS, K.; VARDAKA, E.; LIKOTRAFITI, E. Microbiota and Cyanotoxin

Content of Retail Spirulina Supplements and Spirulina Supplemented Foods.

Microorganisms. 2023.

RODRIGUES, D. P. *et al.* Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1993.

ROSLAND, N. *et al.* Influence of symbiotic probiont strains on the growth of amphora and chlorella and its potential protections against *Vibrio* spp. in artemia. **Current microbiology**. 2021.

SONI, R. A., SUDHAKAR, K., & RANA, R. S. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. **Energy Reports**. 2019.

SURIYA, P; SANGEETHA, S. P. Characterization of *Geobacillus stearothermophilus* and its application in soil stabilization. **Journal of Building Pathology and Rehabilitation**, 2022.

TORTORA, G, J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Alegre: **Artmed**, 2017.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. MARIA.; MELO, I. S. DE biocontrole de fitopatógenos.

VARDAKA E, KORMAS KA, KATSIAPI M, GENITSARIS S, MOUSTAKA M. Molecular diversity of bacteria in commercially available “Spirulina” food supplements. **Peer**. 2016.

YANG, S. *et al.* Cereulide and Emetic *Bacillus cereus*: Characterizations, Impacts and Public Precautions. **Foods**. 2023.

YIN, H., JIA, F., HUANG, J. The variation of two extracellular enzymes and soybean meal bitterness during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. **Grain & Oil Science and Technology**. 2019.

ZHANG, F., MAN, Y. B., MO, W. Y., & WONG, M. H. Review on wastewater treatment and fish growth. **Reviews in Aquaculture**. 2019.

ZHANG, S.X., ZHANG, Q.Q., LIU, Y.S., YAN, X.T., ZHANG, B., XING, C., ZHAO, J.L., YING, G.G., Emission and fate of antibiotics in the Dongjiang River Basin, China: Implication for antibiotic resistance risk. **Science of the Total Environment**. 2020.

ZHU, B. F., & XU, Y. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2010.